MATURAZIONE DEI LINFOCITI B

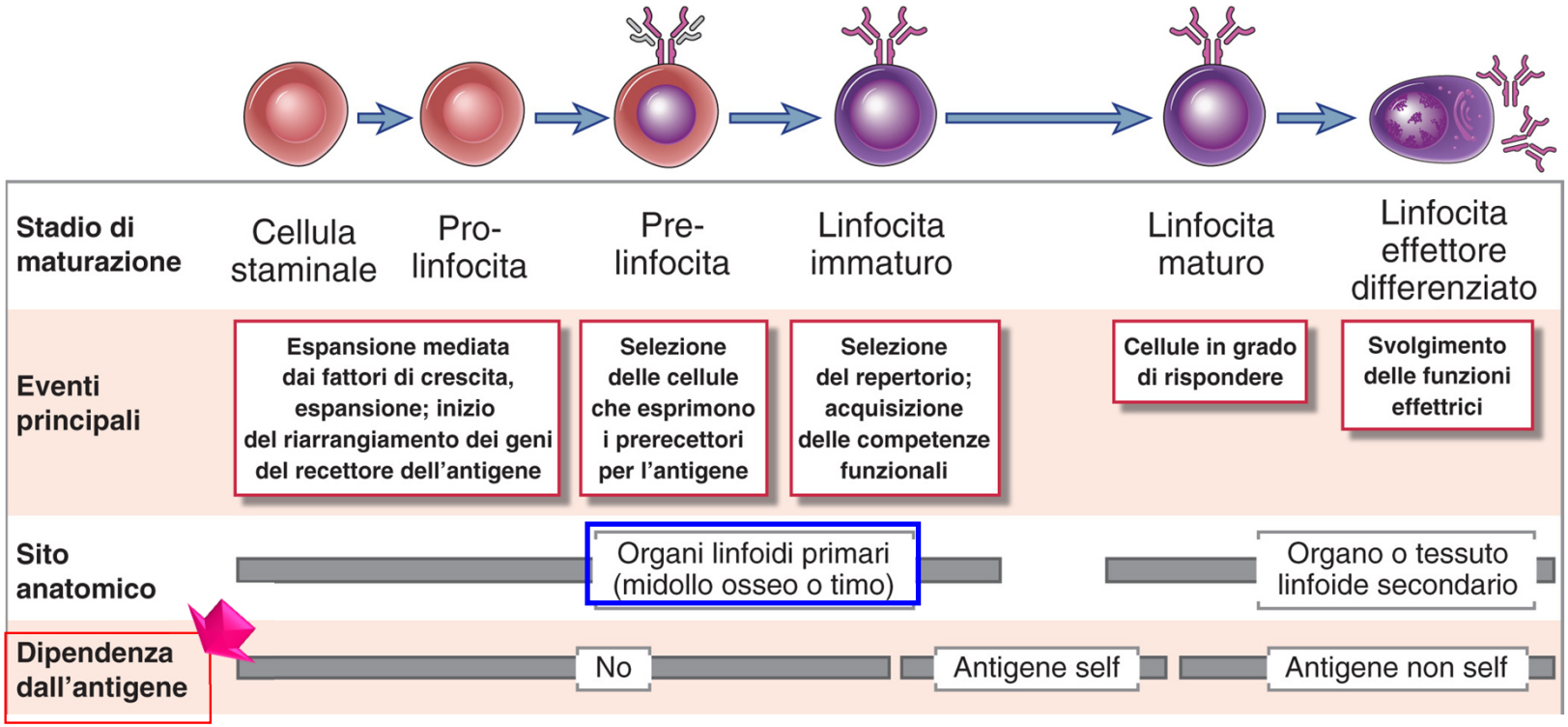
*Processo attraverso il quale i **progenitori dei linfociti** presenti negli organi linfoidi primari (timo e MO) si trasformano in **linfociti maturi** che popolano i tessuti linfoidi secondari.*

*La **specificità antigenica** (acquisizione di tutti i Recettori per l'Antigene) espressa dai linfociti B e T è detta*

repertorio linfocitario

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA MATURAZIONE LINFOCITARIA

Durante la maturazione, Recettori specifici espressi sulle cellule attivano un programma di espressione genica sequenziale che determina il differenziamento di linfociti B e T, conduce alla proliferazione dei progenitori e dà inizio al **riarrangiamento di geni che codificano per i Recettori per l'Ag** (evento centrale dello sviluppo linfocitario).



Abbas 9^ Ed.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA MATURAZIONE LINFOCITARIA

Inizia negli organi linfoidi primari ed è caratterizzata da:

-Orientamento dei progenitori verso la linea B o T

-Proliferazione delle cellule progenitrici e di linfociti a stadi intermedi di differenziazione, per aumentare il numero di cellule in grado di generare linfociti maturi

-Riarrangiamento dei geni del recettore per l'antigene: processo, sequenziale e coordinato, è necessario per la corretta espressione dei diversi recettori per l'antigene

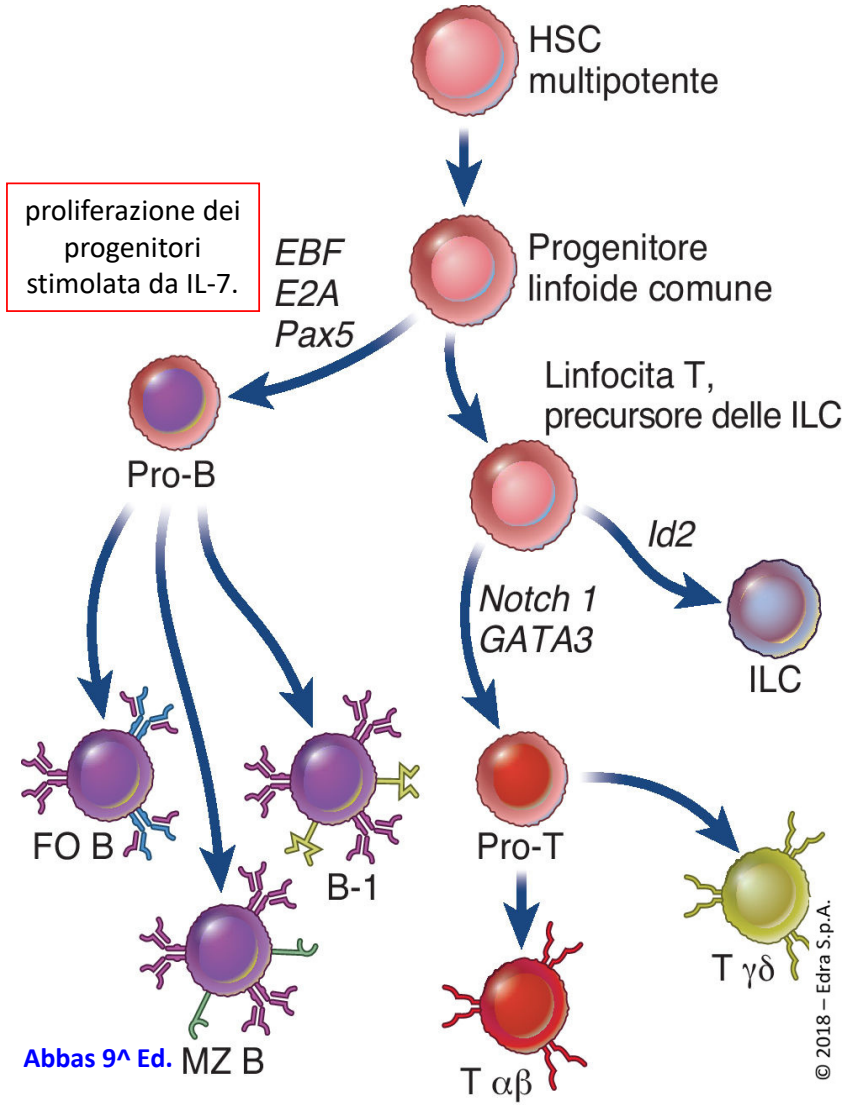
- Eventi selettivi
  -Identificazione delle cellule che presentano un recettore corretto
  -Eliminazione di quelle potenzialmente dannose in grado di riconoscere con elevata affinità gli Antigeni self.
  -Assicurazione dell'espressione di recettori funzionali dotati di specificità "utile" al sistema immune.

-Differenziazione

I linfociti B si differenziano in linfociti B follicolari, in linfociti della zona marginale e in linfociti B-1. I linfociti T si differenziano invece in linfociti CD4+ helper, linfociti CD8+ citotossici e in linfociti T $\gamma\delta$

La differenziazione in classi funzionalmente distinte determina la specializzazione della risposta immune che è la caratteristica del sistema immune adattativo.

Differenziazione dei linfociti B e T



Le cellule staminali pluripotenti presenti nel midollo osseo e nel fegato fetale sono definite **cellule staminali ematopoietiche** e danno origine a **progenitori linfoidi comuni** che daranno origine a linfociti B, T , cellule NK e alcuni tipi di cellule dendriticheb(orientamento).

I precursori dei linfociti T completano la loro maturazione nel timo
Le HSC **midollari** daranno origine alla maggior parte dei linfociti B circolanti (**linfociti B follicolari**), mentre le HSC **epatiche fetali** daranno origine prevalentemente a un tipo di linfociti B definiti **B-1**.

L'indirizzamento verso la linea differenziativa B o T è determinato dall'**attivazione di recettori di membrana** che inducono l'espressione di **specifici fattori trascrizionali.** che inducono l'espressione di **proteine che regolano il processo di riarrangiamento dei geni** che codificano per il **recettore per l'antigene** e rendendo loro accessibili specifici loci genici: nella maturazione di un linfocita B, il locus della catena pesante delle immunoglobuline (Ig), presente in una configurazione a cromatina "chiusa", viene "smascherato" e reso accessibile alle proteine regolatrici che ne determineranno il riarrangiamento e l'espressione.
I precursori dei linfociti B maturano nel **MO** e completano la loro maturazione nei **linfonodi**

I fattori di trascrizione EBF ed E2A contribuiscono all'espressione di un altro fattore di trascrizione (Pax-5) e queste tre proteine determinano la differenziazione dei linfociti B. Questo processo coinvolge la trascrizione di geni che codificano per le proteine Rag-1 e Rag-2, le proteine surrogate delle catene leggere, e per le proteine Igα e Igβ (necessarie per la trasduzione del segnale da parte del recettore per l'**antigene dei linfociti pre-B** e B).

Sviluppo dei linfociti

La fase iniziale dello sviluppo dei linfociti è caratterizzata dalla ***proliferazione dei progenitori stimolata*** da **IL-7.** Si genera un pool di numerose cellule da cui originerà un repertorio molto ampio di ***linfociti Ag-specifici.***
IL-7 è prodotta dalle cellule stromali del MO e del timo (topi con mutazione di IL-7 o del suo R sviluppano un marcato deficit di maturazione con blocco nella fase precoce).

Nell'uomo mutazioni di IL-7R provocano l'***immunodeficienza grave combinata legata al cromosoma X*** (blocco dello sviluppo di linfociti T e cellule NK, i B proliferano anche in assenza di segnale del IL-7R).

L'attività proliferativa nelle fasi precoci dello sviluppo linfocitario, termina prima che il riarrangiamento dei geni per il recettore sia stato completato.
L'ulteriore proliferazione avverrà solo in quelle cellule che avranno correttamente riarrangiato e trascritto il gene per la **prima catena del recettore per l'antigene, originando così un recettore pre-B** (**pre-BCR**).

La selezione delle cellule che hanno **correttamente riarrangiato la catena pesante delle Ig** (per lo stipite B) rappresenta il principale evento responsabile dell'**espansione dei progenitori linfocitari** durante la loro maturazione

MicroRNA e maturazione linfocitaria

I miRNA sono piccoli RNA endogeni, non codificanti, sintetizzati nel nucleo come lunghi trascritti primari. Vengono processati da una **endoribonucleasi**, definita **Drosha**, in pre-miRNA più corti, che si organizzano in una struttura a forcina (stem loop) e vengono esportati nel citoplasma.

Qui, i miRNA immaturi vengono ulteriormente processati da un'altra ribonucleasi, definita **Dicer,** in miRNA più corti a doppia elica, di circa 21-22 bp.

Un'elica dei miRNA può legarsi a una **sequenza complementare presente in diversi mRNA cellulari**.

Gli mRNA cellulari complessati con i miRNA si associano quindi a proteine definite **argonauti**, formando i cosiddetti **complessi RISC** (RNA-Induced Silecing Complex).

Nel caso in cui il miRNA, che può avere una sequenza minima di 6-8 bp, non sia perfettamente complementare all'mRNA legato, quest'ultimo non verrà più tradotto efficientemente.
Nel caso in cui la complementarietà sia perfetta, l'mRNA bersaglio verrà efficientemente degradato. In entrambi icasi, quindi, i geni bersaglio dei miRNA daranno origine a **ridotti livelli di proteina**.

Riarrangiamento ed espressione dei geni che codificano per il recettore per l'antigene

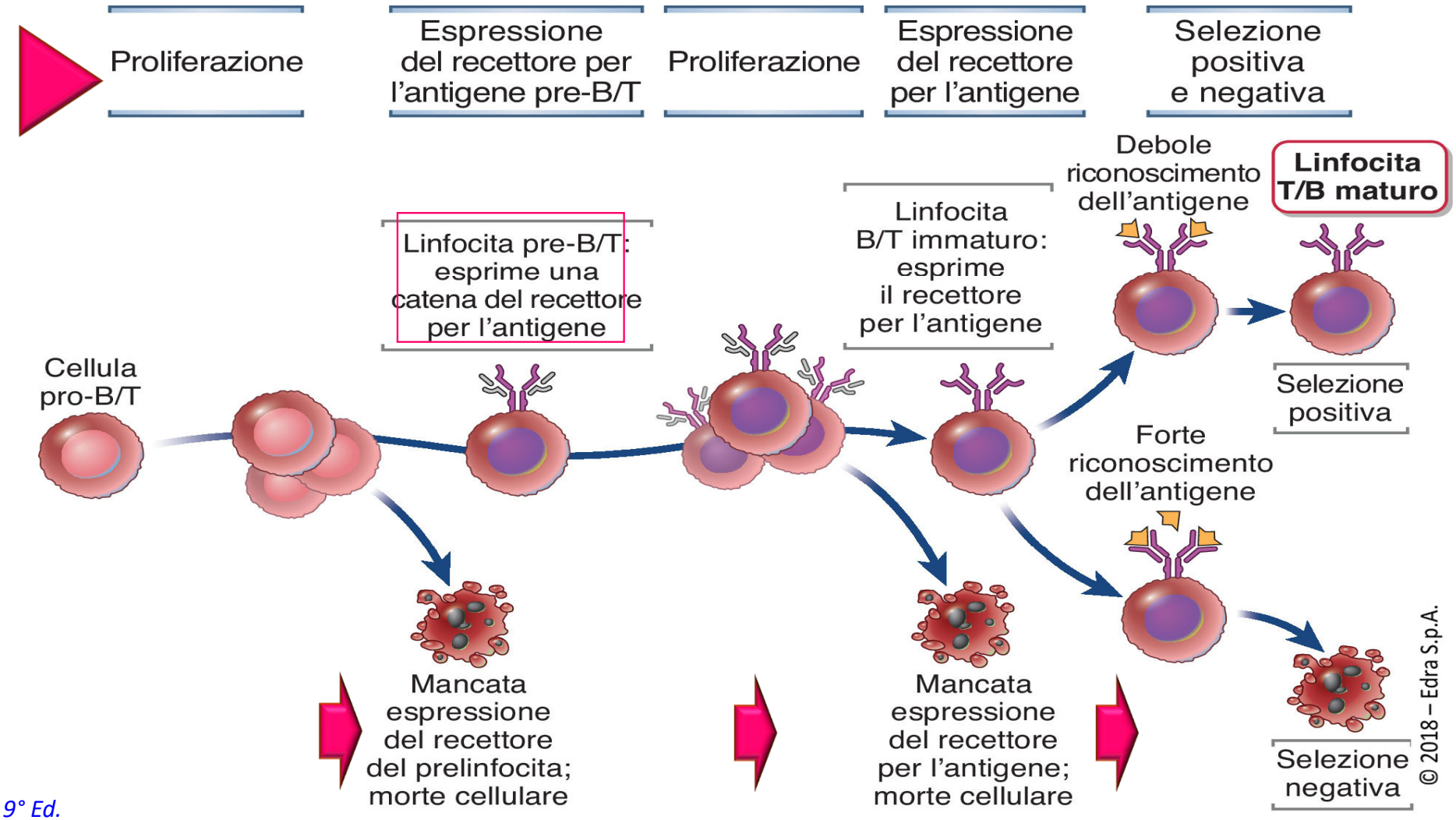
Il **riarrangiamento dei geni del recettore per l'antigene** è l'evento chiave nella maturazione linfocitaria, essenziale per la **generazione di un repertorio diversificato**.

In ogni individuo esistono più di 10^7 diversi cloni di linfociti B e T, ognuno dotato di uno specifico recettore. La capacità di generare un repertorio linfocitario così diversificato si è sviluppata in modo tale **da non richiedere un corrispondente numero di geni che codifichino per i recettori per l'antigene.**

I geni in grado di codificare per i recettori per l'antigene sono prodotti nei linfociti B immaturi, nel midollo osseo, attraverso un processo di riarrangiamento genico che genera un enorme numero di esoni, in grado di codificare per la **regione variabile del recettore**, partendo da una frazione di genoma piccola: **uno dei tanti segmenti dei geni che codificano per la regione variabile viene scelto a caso e coniugato a un segmento di DNA successivo:** tagli specifici e ricongiungimento con un meccanismo detto **ricongiunzione delle porzioni terminali non omologhe**.

Gli eventi di riarrangiamento del DNA non dipendono e **non sono influenzati dalla presenza dell'Ag**, i **Recettori** per l'Ag sono **espressi prima dell'incontro con l'Ag stesso**.

Processo di selezione per il repertorio dei linfociti B e T



Abbas 9° Ed.

Durante lo sviluppo linfocitario sono presenti numerosi **punti di controllo** i quali assicurano che solo le cellule che hanno correttamente portato a termine le varie fasi della differenziazione proseguano nel processo di maturazione.

1) **Corretta espressione di una delle due catene del recettore per l'antigene**
2) **corretto assemblaggio e la funzionalità del recettore completo.**

Sono selezionati per l'ulteriore maturazione solo quei linfociti che, avendo completato correttamente il riarrangiamento dei geni per il recettore, possono svolgere correttamente la loro funzione al termine della maturazione.

I punti di controllo successivi avranno lo scopo di **eliminare i linfociti autoreattivi**, potenzialmente pericolosi, oppure di orientare i linfociti verso specifiche forme di **differenziazione**.

Durante il processo maturativo, sia i prerecettori per l'antigene sia i recettori per l'antigene trasmettono segnali essenziali per la sopravvivenza, la proliferazione e la continuazione del processo maturativo dei linfociti

Il riarrangiamento dei geni per i recettori per l'antigene prevede l'esposizione di particolari loci genici e quindi la loro fusione con particolari segmenti di DNA necessari a generare un recettore funzionale.

Al fine di ottenere la massima diversificazione possibile, diversi nucleotidi vengono inoltre aggiunti o rimossi casualmente dai segmenti genici che si congiungono. Nel corso della maturazione linfocitaria, i primi geni a essere completamente riarrangiati sono quelli per la **catena pesante delle Ig** (gene *Ig H*) nei linfociti B.

I precursori dei linfociti B che avranno **riarrangiato correttamente i geni per le catene pesanti delle Ig** esprimeranno quindi la **catena Ig H**, che agirà da **recettore provvisorio** (**pre-BCR**): Solo un terzo dei precursori dei linfociti B riescono a portare a termine tale processo in modo corretto generando così una proteina completa e funzionale.

I linfociti che **superano questo controllo** potranno **maturare ulteriormente negli organi linfoidi primari** fino a **esprimere il recettore completo per l'antigene**.

In questa fase, i linfociti sono ancora in uno **stadio immaturo** in cui le cellule autoreattive, potenzialmente pericolose, possono essere eliminate o indotte a modificare i propri recettori, mentre quelle che esprimono recettori "utili" vengono mantenute in vita: **selezione positiva** indissolubilmente connessa al processo di differenziazione dei linfociti.

La **selezione negativa** è il processo che elimina o modifica i linfociti dotati di **recettori che riconoscono con elevata affinità gli antigeni self** presenti negli organi linfoidi primari:

I linfociti B immaturi dotati di forte autoreattività possono essere indotti a **riarrangiare ulteriormente i geni delle Ig al fine di modificare la loro specificità**, fenomeno chiamato **editing recettoriale**. Se l'editing recettoriale non va a buon fine, il linfocita B autoreattivo muore per **delezione clonale** (apoptosi).

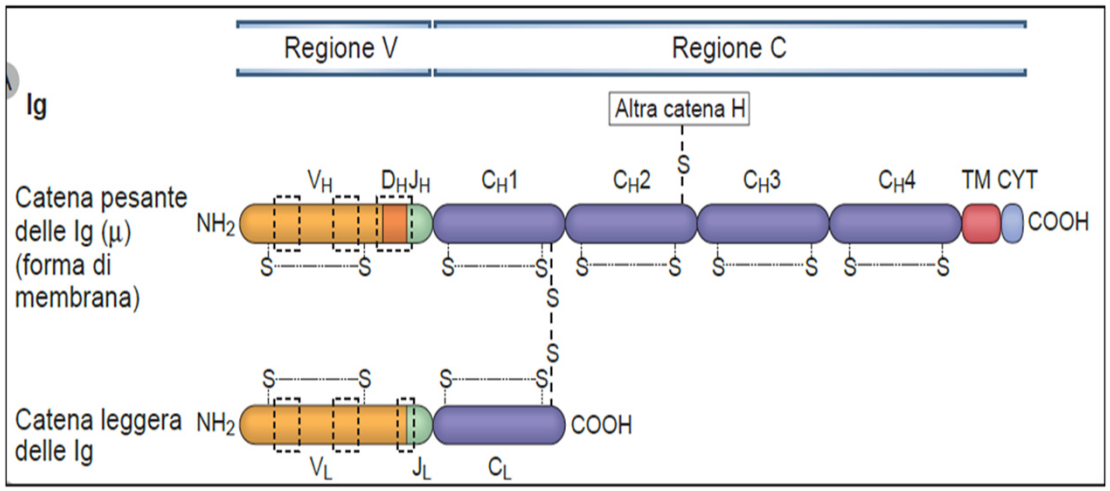
La **selezione negativa** dei linfociti rappresenta un importante meccanismo per il mantenimento della tolleranza verso gli antigeni self, fenomeno definito **tolleranza centrale**, poiché avviene negli **organi linfoidi centrali** (primari)

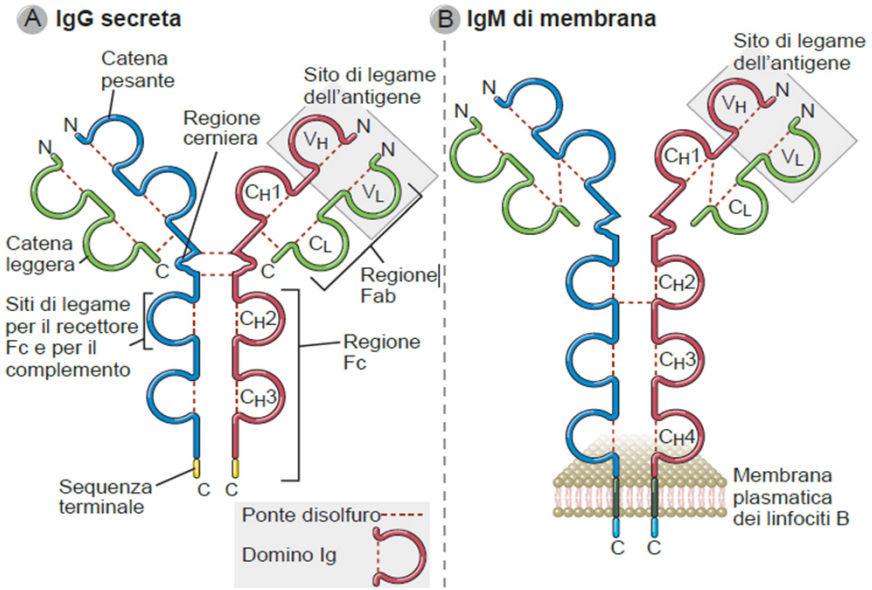
I geni per i diversi recettori per l'antigene sono generati nei singoli linfociti dal riarrangiamento di diversi **segmenti della regione variabile** (V) con segmenti della regione della **diversità** (D) e/o quelli della **ricongiunzione** (J, dall'inglese **joining**).

Per ognuno di questi geni viene **generato un nuovo esone** **riarrangiato** mediante la fusione di un segmento a monte con uno a valle del gene V sullo stesso cromosoma. Questo peculiare processo di riarrangiamento selettivo è definito

ricombinazione V(D)J (*ricombinazione* o *riarrangiamento*)

Le catene polipeptidiche di anticorpi dello **stesso isotipo** **condividono le sequenze presenti all'estremità C-terminale** (corrispondente, nel gene, alla regione che codifica per i domini costanti delle catene leggere e pesanti), ma differiscono anche notevolmente nelle regioni situate all'**estremità N-terminale**, corrispondenti, nel gene, a quelle che codificano per i **domini variabili**





Dreyer e Bennett 1965 postularono che ciascuna catena anticorpale fosse in realtà codificata da almeno due geni, uno variabile e l'altro costante, che si uniscono fisicamente a livello del DNA o dell'RNA messaggero (mRNA) per generare le Ig.

Susumu Tonegawa dimostrò che nelle cellule del mieloma o del plasmocitoma (un tumore secernente anticorpi) la struttura dei geni per le Ig è diversa da quella presente nelle cellule dei tessuti embrionali o comunque non linfoidi non destinati a produrre Ig.

Queste differenze si generano poiché **sequenze di DNA presenti nei loci che codificano per le catene pesanti e leggere delle Ig si riarrangiano solo nei linfociti B in corso di maturazione ma non in altre cellule**

Organizzazione dei geni delle Ig nella linea germinativa

La configurazione **germinativa dei loci genici per le Ig e è fondamentalmente simile in tutte le cellule** ed è caratterizzata dalla **segregazione spaziale di sequenze multiple che codificano per i domini variabili e costanti dei diversi recettori.**

Distinte sequenze codificanti per le **regioni variabili** vengono congiunte a sequenze che codificano per le **regioni costanti**, per generare i singoli linfociti.

Tre loci separati codificano rispettivamente per tutte le **catene pesanti**, le **catene leggere di tipo** κ e quelle di **tipo** λ delle Ig. Ogni locus è localizzato su un **diverso cromosoma**

Tre loci separati codificano per tutte le **catene pesanti** [**Cr. 14**]; **catene leggere k** [**Cr.2**]; **catene leggere λ** delle Ig [**Cr.22**].

All'estremità 5' di ciascun locus per le Ig vi è un cluster di **segmenti genici V**. Localizzato al 5' di ogni segmento V c'è un **esone "leader"** che codifica i 20-30 residui N-terminali della proteina

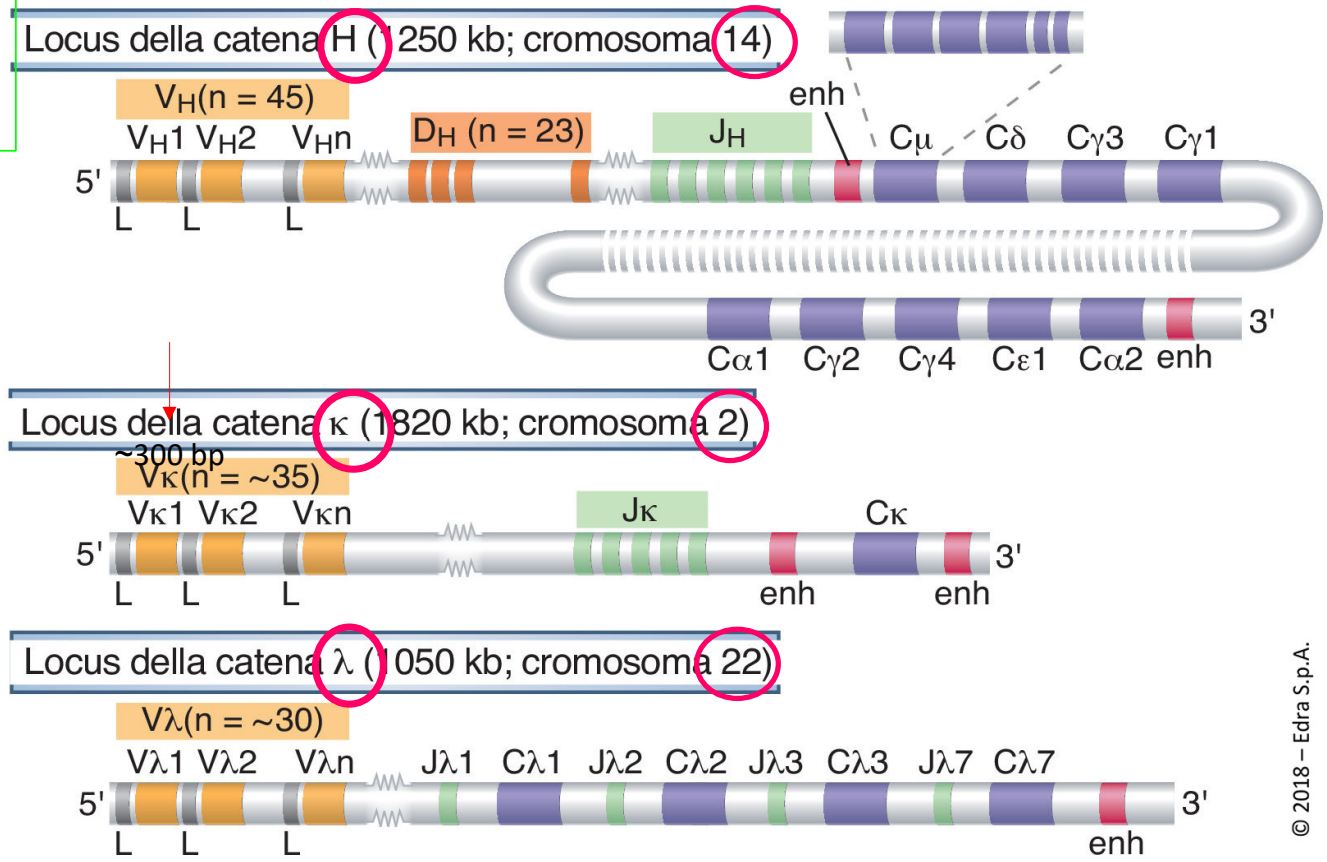
45 geni V per le catene pesanti **μ**

35 geni V per la catena leggera ***κ***,

30 geni V per la catena leggera **λ**

A distanza variabile, in posizione 3' rispetto ai geni V, si trovano i **segmenti J**, strettamente associati agli esoni che codificano per la regione costante localizzati più a valle.

loci per le catene pesanti (H) e leggere κ e λ



© 2018 – Edra S.p.A.

Tra i geni V e J, nel locus H, ci sono sequenze codificanti aggiuntive i **segmenti D** (diversità): Mancano nei loci delle catene L

Abbas 9^ Ed.

Diversificazione dei linfociti B

La varietà del repertorio dei linfociti B è generata dal riarrangiamento casuale dei geni per le Ig e dall'aggiunta o dalla rimozione di sequenze addizionali alle estremità dei segmenti genici riarrangiati.

Diversità combinatoriale

La ricombinazione V(D)J coinvolge molteplici segmenti genici della linea germinativa che possono combinarsi casualmente, producendo diversi recettori.

La diversità combinatoriale è ulteriormente aumentata dalla giustapposizione di due regioni V diverse, generate in modo casuale (cioè nell'appaiamento di VH e VL nelle Ig).

il vero grado di diversificazione presente in ogni individuo è molto inferiore a quello ipotizzato perché non tutte le ricombinazioni dei segmenti genici hanno la stessa probabilità di realizzarsi e non tutte le coppie di catene riescono a formare recettori per l'Ag funzionali.

Il numero di geni J e D può variare nei diversi loci Ig e nelle diverse specie.

Numero dei segmenti genici nei geni della Ig umana

Segmento	Catene leggere		Catena pesante
	κ	λ	H
Segmenti variabili (V)	34–38	29–33	38–46
Segmenti di diversità (D)	0	0	23
Segmenti di giunzione (J)	5	4–5	6
Segmenti costanti (C)	1	4–5	9

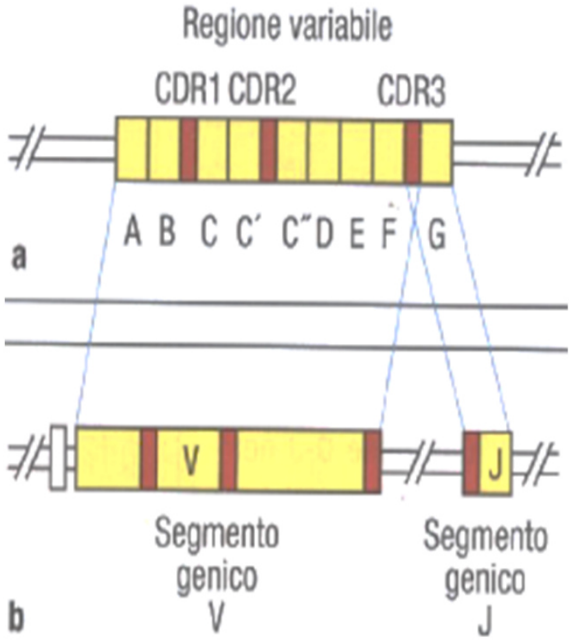
Il numero massimo possibile di combinazioni di questi segmenti genici è il **prodotto del numero di segmenti genici di V, J e (se presente) D in ogni locus**.
Ne deriva che l'entità della diversità combinatoriale che può essere generata in ogni locus **riflette il numero di segmenti genici dei loci germinativi di V, J e D.**

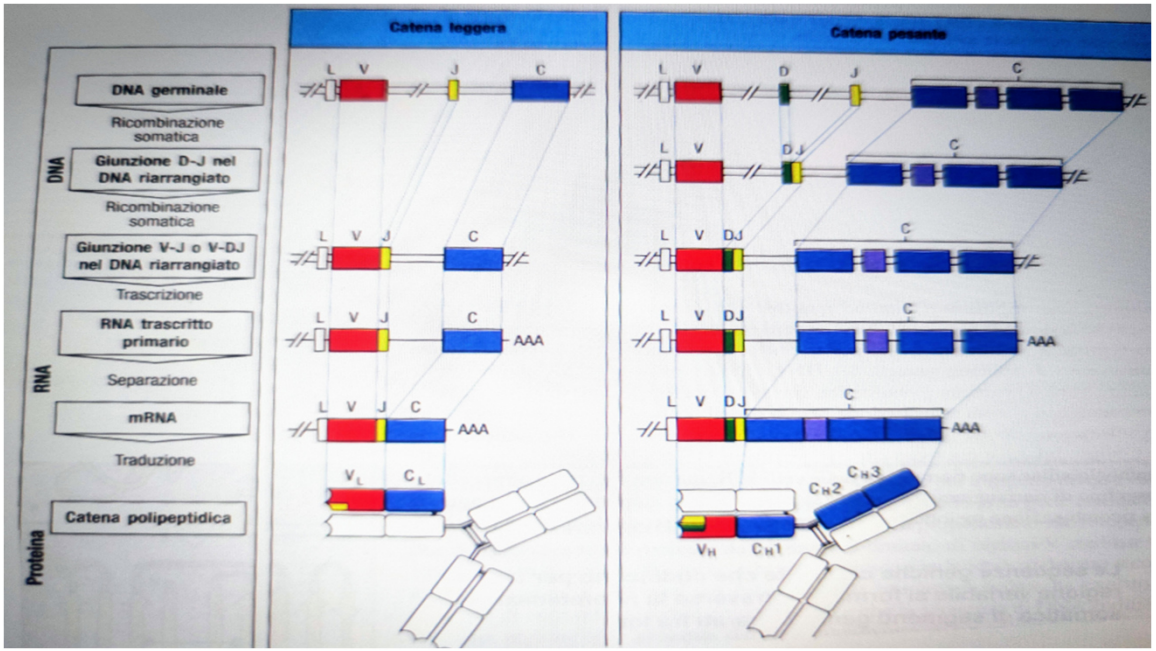
Catena H = **V** x **D** x **J**

Catena L = **V** x **J**

Ogni locus per le Ig subisce un proprio **riarrangiamento** che coinvolge un certo **numero di geni della regione C**.

Il **locus per la catena leggera** κ delle Ig ha un singolo gene C (Cκ), mentre il locus per la catena leggera λ ha 4 geni C funzionali (Cλ).
Il **locus per la catena pesante** delle Ig ha 9 geni C (C_H), localizzati in modo tale da codificare i 9 diversi isotipi e sottotipi delle Ig.
I geni Cκ e Cλ sono composti ognuno da un solo esone, che codifica per l'intera catena leggera.
Ogni gene C_H è composto da 5 o 6 esoni; 3 o 4 di questi codificano per la sequenza C_H della catena pesante delle Ig, mentre 2 esoni di dimensioni minori codificano per la porzione carbossiterminale della forma di membrana, inclusi i domini transmembrana e citoplasmatico





Nelle **catene leggere κ e λ**, il dominio V è codificato da segmenti dei geni V e J, mentre nelle **catene pesanti** il dominio V è codificato da segmenti dei geni V, D e J.
Tutti i residui giunzionali posti a cavallo dei segmenti V e D o D e J riarrangiati, così come le stesse sequenze dei segmenti D e J, formano la cosiddetta ***terza regione ipervariabile*** (conosciuta anche come *regione che determina la complementarietà 3* o CDR3) presente nelle Ig.

Le regioni CDR1 e CDR2 sono codificate nella configurazione germinativa da un segmento presente in ogni gene V.
I domini V e C delle Ig hanno caratteristiche strutturali simili, compresa la struttura terziaria, definita ***dominio Ig***.

Le sequenze non codificanti dei loci Ig svolgono un ruolo importante nella ricombinazione e nell'espressione dei diversi loci genici.

Diversità giunzionale

Contribuisce alla maggiore diversificazione dei recettori per gli Ag.
È dato dalla **rimozione** o dall'**aggiunta** di **nucleotidi tra le terminazioni dei segmenti genici V e D, D e J o V e J al momento della loro ricongiunzione.**

Rimozione, a opera di endonucleasi, di nucleotidi dalla sequenza germinativa alle estremità dei segmenti genici che si ricombinano. Inoltre, nuove sequenze nucleotidiche (non presenti nella configurazione germinativa) possono essere aggiunte nei siti di giunzione.

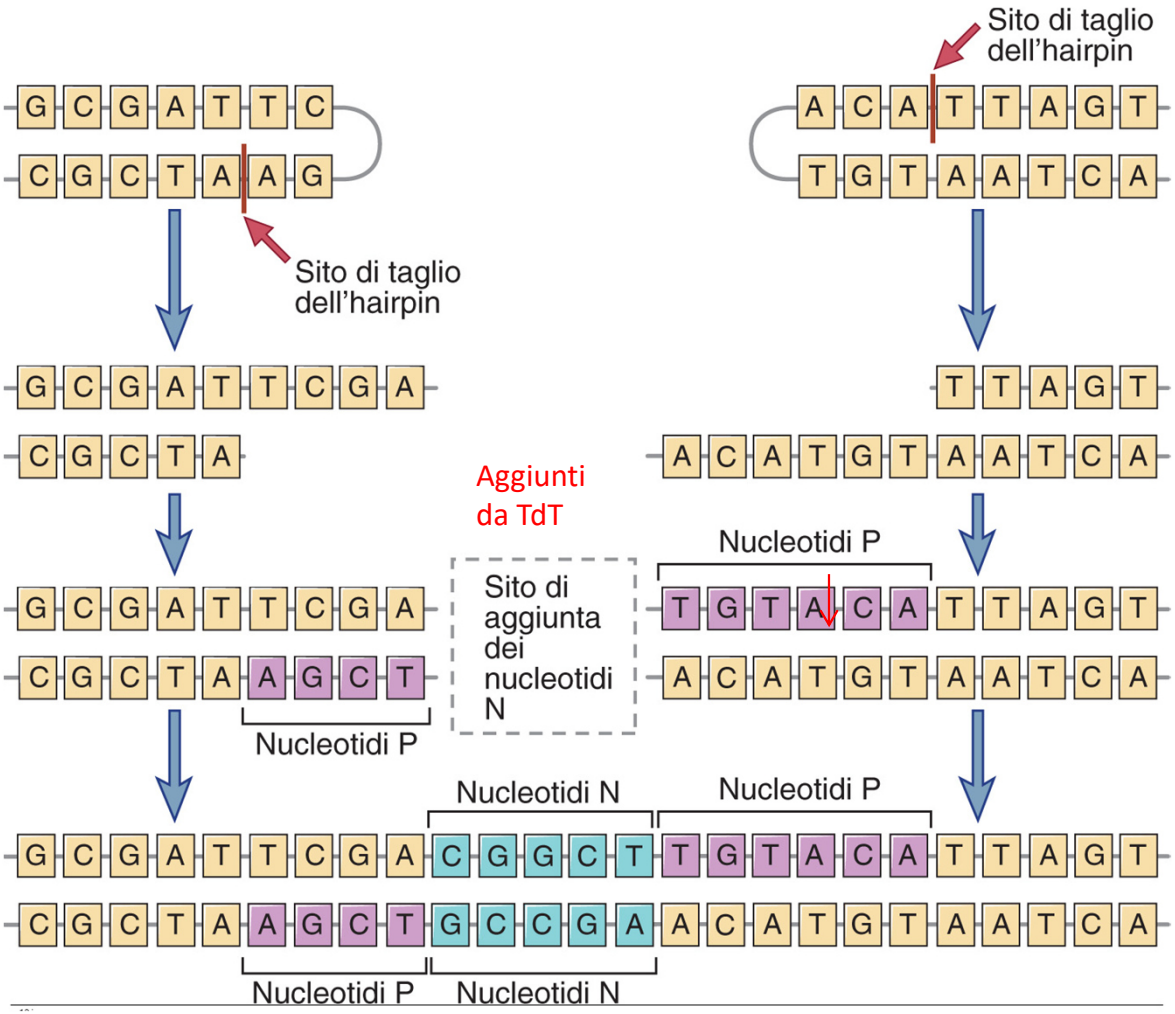
Conferisce agli anticorpi la massima variabilità in corrispondenza delle giunzioni delle regioni V e C che formano la terza regione ipervariabile (**CDR3**)

Queste regioni sono anche le più importanti nella determinazione della specificità del legame con l'Ag.
La diversità giunzionale aumenta il numero delle diverse sequenze di Aminoacidi presenti nelle regioni CDR3 delle Ig rispetto al numero che può essere codificato dai segmenti genici presenti nella linea germinativa.

la diversificazione dei recettori è concentrata nelle regioni che sono più importanti per il legame con l'Ag.

La diversificazione della regione N e più frequente nella catena pesante delle Ig.
Il numero delle diverse sequenze aminoacidiche presenti nelle regioni CDR3 delle Ig è nettamente maggiore del numero che può essere codificato dai segmenti genici presenti nella linea germinativa.

Diversificazione giunzionale



Abbas 9^ Ed.

L'aggiunta o la rimozione di nt può portare alla **generazione di nuovi nucleotidi** (e sequenze di Aa) **nel punto di giunzione**

Comparsa di nuove sequenze assenti nella configurazione germinativa

Segmenti codificanti (per esempio, V e J), una volta tagliati dalla Rag-1, formano strutture hairpin (struttura a forcina) le cui estremità sono spesso scisse asimmetricamente da **Artemis**: un tratto di DNA rimane più lungo dell'altro. Il tratto più corto deve essere esteso con nucleotidi complementari fino al tratto più lungo prima della giunzione dei due segmenti. Le sequenze nucleotidiche neosintetizzate sono definite *nucleotidi P* e la loro aggiunta codificata su uno stampo introduce nuove sequenze nella giunzione V-D-J.

Un ultimo meccanismo di diversificazione giunzionale è legato all'aggiunta casuale di un massimo di 20 nucleotidi casuali definiti nucleotidi N mediata dall'**enzima TdT (**desossiribonucleotidil transferasi terminale): più comune nella catena pesante delle Ig.

Può provocare slittamenti dello schema di lettura: generazione di codoni di stop (proteina non funzionale: prezzo da pagare per diversificazione)

CARATTERISTICHE DELLA DIVERSIFICAZIONE

Nei linfociti B della zona scura che stanno proliferando, i geni V che codificano per le Ig vanno incontro a un'enorme frequenza di mutazioni puntiformi. Per ogni divisione cellulare tale frequenza è 1 mutazione per ogni 103 paia di basi del gene V: **ipermutazione somatica**.

Le sequenze nucleotidiche codificanti per le IgG di un determinato clone possono raggiungere fino al 5% di divergenza dalla sequenza nucleotidica originale della linea germinativa. Ciò equivale a più di 10 sostituzioni aminoacidiche.

Tali mutazioni presentano alcune importanti caratteristiche:
1) nei segmenti genici V, le mutazioni si concentrano principalmente in corrispondenza delle regioni che determinano la complementarietà;
2) avvengono più mutazioni nelle IgG rispetto alle IgM;
3) la presenza di mutazioni correla con l'aumento dell'affinità degli anticorpi diretti contro l'antigene che ha originato la risposta.

L'enzima AID (*Activation-Induced Deaminase)*, svolge un ruolo essenziale nella **maturazione dell'affinità.**
AID è una DNA-deaminasi che **converte in uracile i residui di citosina**, presenti in sequenze di DNA particolarmente importanti

#1 Meccanismo di ricombinazione V(D)J

Il riarrangiamento dei geni per Ig è un particolare tipo di ricombinazione che coinvolge *segmenti genici non omologhi* ed è mediato dall'attività coordinata di molti enzimi che svolgono un ruolo nel processo di riparazione della doppia elica del DNA [enzimi DSBR = Double Strand Break Repair].

L'esone riarrangiato viene trascritto a formare un RNA nucleare primario.

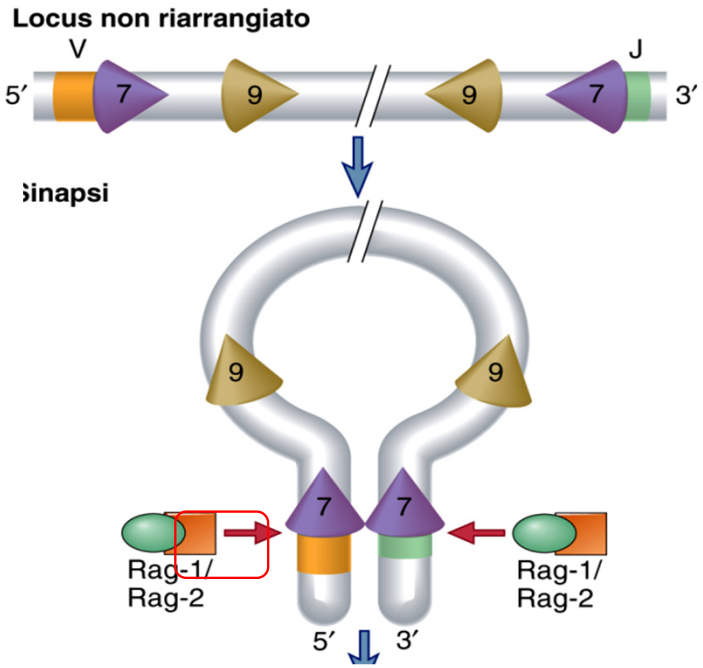
Il successivo processo di splicing dell'RNA unirà l'esone leader, l'esone V(D)J e l'esone per la regione C, formando così un mRNA che, a livello ribosomiale, può essere tradotto a formare una delle catene del recettore per l'antigene.

Le **ricombinasi RAG-1/RAG-2** riconoscono sul DNA delle sequenze dette **RSS** [***Recombination Signal Sequences***] a livello dei segmenti V, D e J,

Sono localizzate all'estremità 3' dei segmenti del gene V,

all'estremità 5' dei segmenti J e ai due estremi dei segmenti D.

Sono costituite da un motivo altamente conservato costituito da 7 basi detto **eptamero: CACAGTG**, seguito da **12 o 23 nt non conservati** (che corrispondono rispettivamente a uno o due giri completi dell'elica del DNA) seguiti da una sequenza di 9 nt: **nonamero.** L'intervallo di 12 o 23 nt porta l'eptamero e il nonamero in posizione che l'enzima possa processarlo.

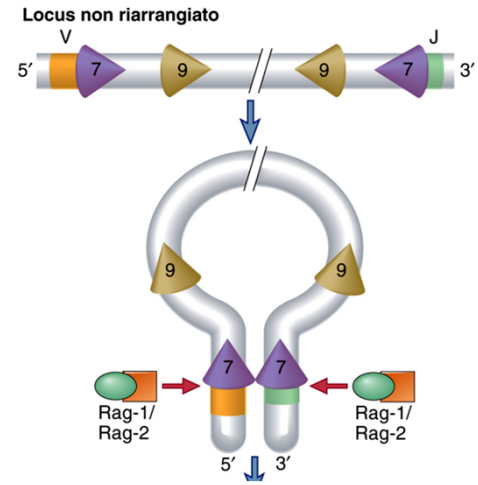


Abbas 9^ Ed.

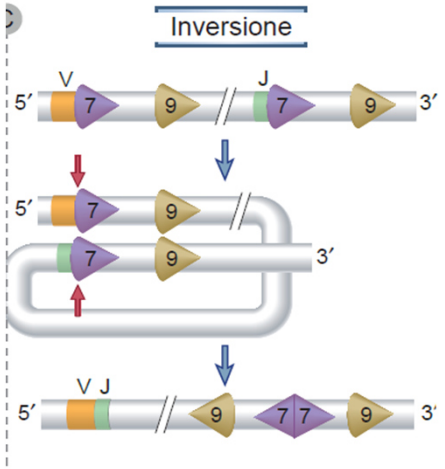
Durante la **ricombinazione V(D)J** vengono effettuati dei tagli nella doppia elica tra l'eptamero delle RSS e le sequenze V, D o J adiacenti.

Durante la **ricombinazione V-J** della catena leggera delle Ig, i tagli verranno effettuati all'estremità 3' di un segmento V e a quella 5' di un segmento J.

Il frammento di DNA a doppia elica tagliato, che contiene le parti terminali dei segnali (a loro volta contenenti l'eptamero e il resto delle RSS) viene rimosso sotto forma di anello. A ciò segue la ricongiunzione delle due estremità e quindi delle sequenze codificanti per V e J

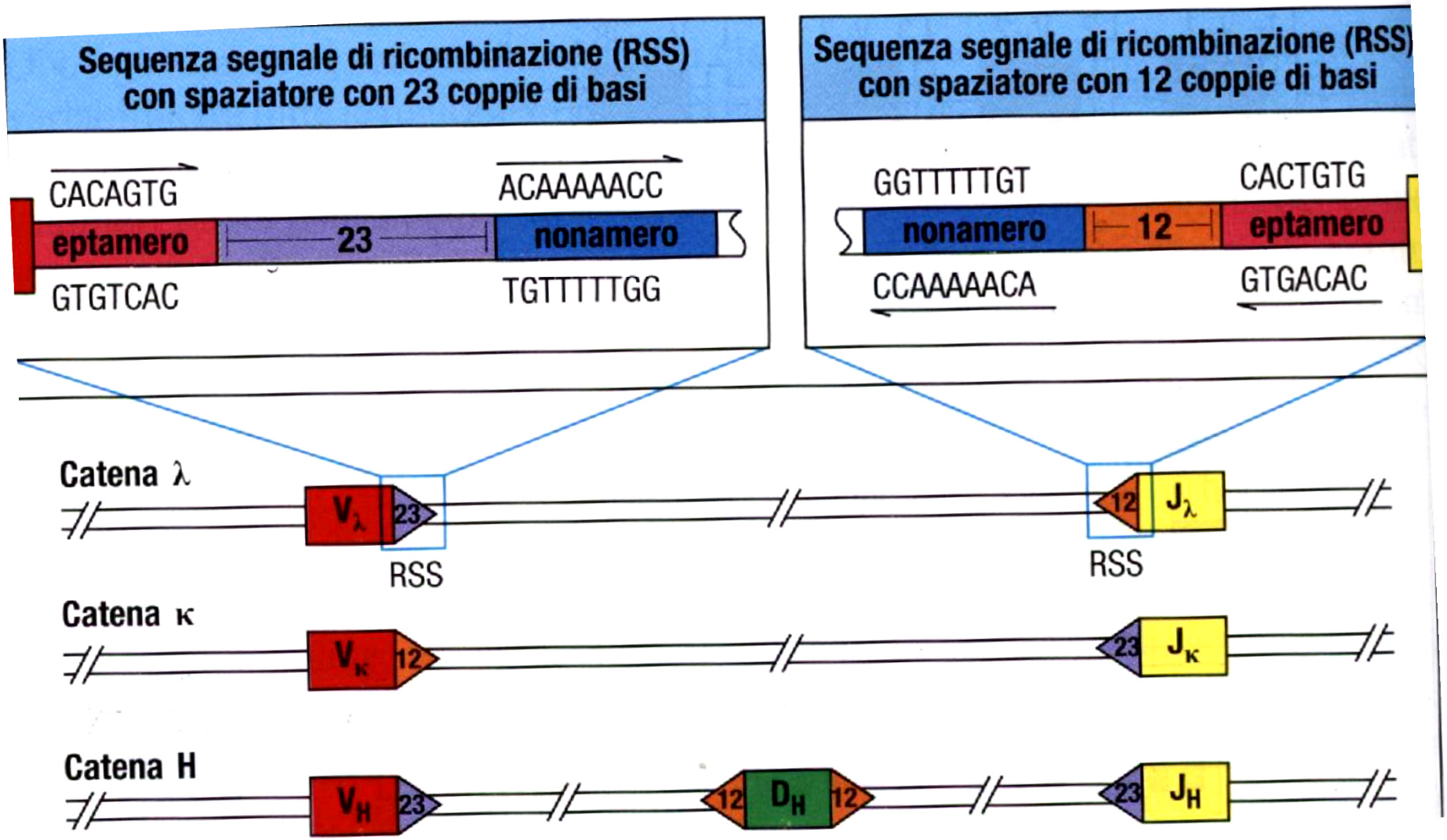


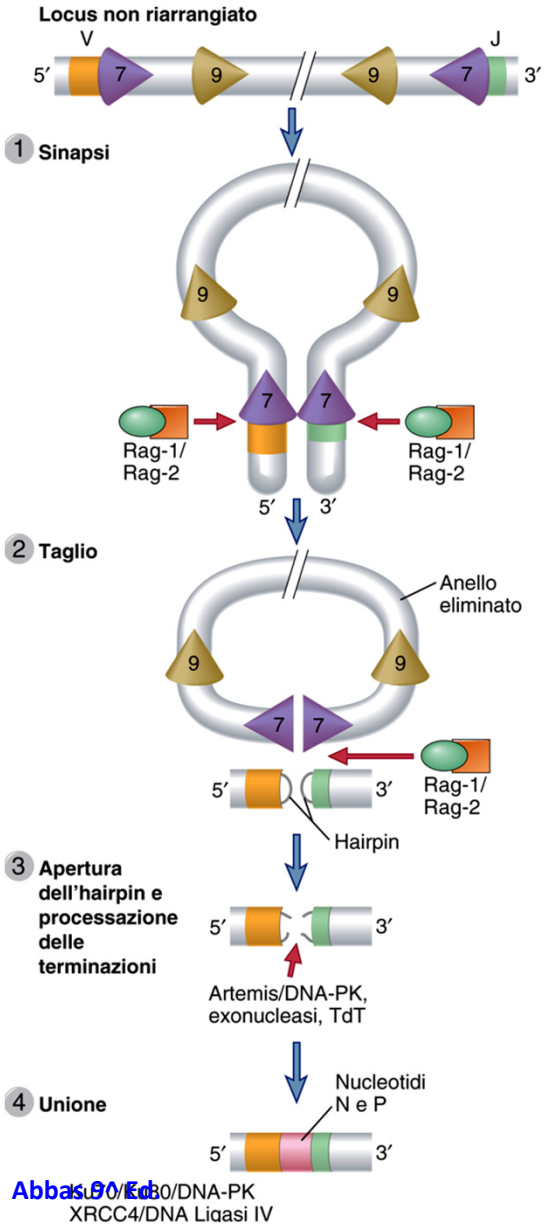
Alcuni geni V (specialmente quelli nel locus per le catene κ delle Ig) sono disposti **nello stesso orientamento dei segmenti J**, in modo che le loro RSS legate non siano in corrispondenza l'una dell'altra: DNA intermedio viene invertito, gli esoni V e J vengono opportunamente allineati e le RSS così congiunte non vengono eliminate, bensì conservate nel cromosoma



La ricombinazione si verifica tra due segmenti soltanto se **uno dei due segmenti è affiancato da uno spaziatore di 12 nucleotidi e l'altro da uno di 23 nucleotidi**, definendo la cosiddetta **"regola 12/23":** un segmento codificante dotato di una RSS a un giro completo di elica di DNA ricombina sempre e solo con un segmento dotato di una RSS a due giri completi di elica di DNA.

Nel **locus della catena pesante delle Ig**, le RSS affiancate ai segmenti sia V sia J hanno spaziatori di 23 nucleotidi: non si legano tra loro; deve **prima avvenire la ricombinazione D-J** e **dopo la ricombinazione V-DJ**: è possibile poiché i **segmenti D sono affiancati su ambo i lati da spaziatori di 12 nucleotidi**, prima legame D-J e poi quello V-DJ.

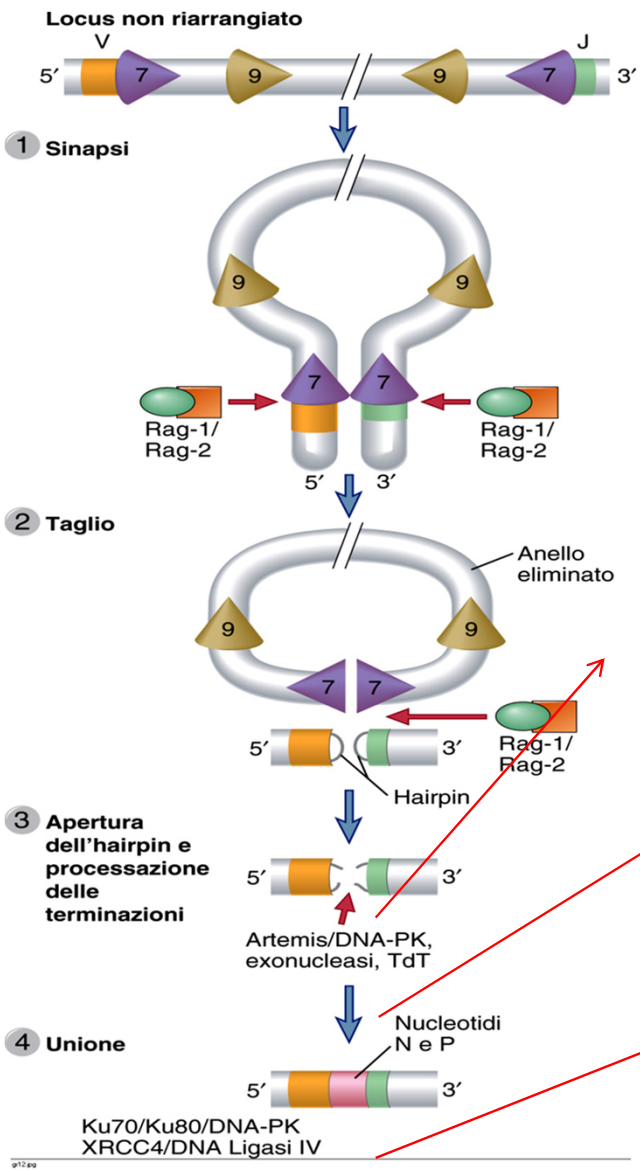

Sequenza segnale di ricombinazione (RSS) con spaziatore con 23 coppie di basi
CACAGTG
ACAAAAACC
eptamero
23
nonamero
GTGTCAC
TGTTTTTGG
Sequenza segnale di ricombinazione (RSS) con spaziatore con 12 coppie di basi
GGTTTTTGT
CACTGTG
nonamero
12
eptamero
CCAAAAACA
GTGACAC
Catena λ
V_λ
23
RSS
12
J_λ
RSS
Catena κ
V_κ
12
23
J_κ
Catena H
V_H
23
12
D_H
12
23
J_H



Abbas 9th Ed.

#2 Meccanismo di ricombinazione V(D)J

1. ***SINAPSI:*** parti del cromosoma sono rese accessibili ai componenti del processo di ricombinazione; 2 specifici segmenti codificanti e le RSS vengono a contatto grazie alla formazione di un anello sul **cromosoma** (*Chromosomal looping*) e sono mantenuti in questa posizione per tutto il tempo (taglio, processazione, unione)
2. ***TAGLIO:*** processo enzimatico in cui si formano le rotture del doppio filamento di DNA alle giunzioni tra RSS e sequenze codificanti (processo specifico dei linfociti). Due proteine codificate da geni attivanti la ricombinazione 1 e 2 (Recombination-activating gene 1 and 2, **Rag-1** e **Rag-2**), si assemblano in un tetramero, conosciuto anche come **ricombinasi V(D)J**
3. ***CODIFICA e PROCESSAZIONE:*** le estremità codificanti tagliate (ma non le RSS) vengono modificate dall'aggiunta o dalla rimozione di basi, facendo così aumentare la diversificazione.
4. ***UNIONE:*** le estremità codificanti tagliate sono riunite mediante il processo di riparazione delle rotture del doppio filamento **"unione delle estremità non omologhe" = NHEJ** [***Non-Homologous End-Joining***].



Gli enzimi **RAG-1** (endonucleasi) e **RAG-2** mediano la ricombinazione. Rag-1, attiva quando è complessata a Rag-2 taglia le sequenze di giunzione tra eptameri e segmenti codificanti. Le proteine Rag-1 e -2 contribuiscono anche a mantenere uniti i segmenti genici durante il processo di ripiegamento del cromosoma (sinapsi).

Rag-1 taglia una delle eliche di DNA tra l'estremità codificante e l'eptamero. La terminazione 3' OH dell'estremità codificante così generata si lega all'altro filamento formando una **struttura a forcina** (*hairpin*). L'altra estremità forma una terminazione troncata a doppio filamento che non viene processata.

L' hairpin chiusa di un segmento codificante si trovi di fronte all'hairpin chiusa dell'altra estremità codificante

Dopo il taglio della doppia elica, gli hairpin devono essere linearizzati. ***Artemis*** è un'endonucleasi che apre le hairpin alla terminazione delle sequenze codificanti per permettere l'**aggiunta di nucleotidi** (diversificazione). L'assenza di Artemis impedisce la maturazione dei linfociti B e T (immunodeficienza)

La Terminal deossinucleotidil Transferasi [TdT] aggiunge basi alle terminazioni neoformate

Unione delle estremità non omologhe ad opera della DNA Ligasi IV e di XRCC4, una subunità non catalitica ma essenziale per l'attività della ligasi.

Ku70 e Ku80 sono due proteine che ricongiungono le terminazioni di DNA e reclutano la subunità catalitica dell'enzima DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*), in grado di riparare la doppia elica di DNA (Assenza: *Severe Combined ImmunoDeficiencies*, SCID) (DNA-PK fosforila e attiva Artemis)

Abbas 9^ Ed.

SVILUPPO DEI LINFOCITI B

I principali eventi che si verificano nel corso della maturazione dei linfociti B sono il riarrangiamento e l'espressione dei geni delle Ig che avvengono secondo un ordine ben preciso:

1) ***selezione e la proliferazione dei linfociti B che esprimono il prerecettore per l'antigene e***
2) ***successiva selezione del repertorio dei linfociti B maturi***

Durante lo sviluppo embrionale i linfociti B si sviluppano nel fegato fetale a partire da specifici precursori; dopo la nascita, vengono invece generati nel midollo osseo.
La maggior parte dei linfociti B deriva da progenitori adulti midollari che inizialmente non esprimono le Ig.

Successivamente queste cellule danno origine a linfociti B immaturi che esprimono le IgM di membrana e lasciano il midollo per continuare la loro maturazione soprattutto nella milza.

Qui le cellule che daranno origine ai **linfociti B follicolari** esprimono sulla **membrana le IgM e le IgD** e acquisiscono la capacità di ricircolare andando così a popolare tutti gli organi linfoidi secondari.

Nel corso della loro maturazione, i linfociti B passano attraverso stadi ben distinti, ognuno caratterizzato da specifici marcatori di superficie e dall'espressione di uno specifico profilo di Ig

RIARRANGIAMENTO DEI GENI PER IL BCR

I linfociti B passano attraverso stadi distinti caratterizzati da marcatori di superficie e dall'espressione di un profilo di Ig specifico

Cellula pro-B

Il **primo progenitore midollare** orientato verso la linea B è chiamato **cellula pro-B**.

I linfociti pro-B non producono Ig ma possono essere distinti dalle altre cellule immature per l'espressione di molecole di superficie tipiche dei linfociti B, come **CD19** e **CD10**

Sono espresse le proteine Rag che mediano la prima ricombinazione dei geni del locus della **catena pesante delle Ig**. Questa ricombinazione avvicina un **segmento D a un segmento J**, con delezione del DNA interposto

Dopo, uno dei molti geni **V è ricongiunto al segmento DJ** neoformato, originando **un esone VDJ riarrangiato**

La ricombinazione di V con DJ nel locus della catena H delle Ig si verifica solo nei **precursori dei linfociti B** ed è un **evento critico nell'espressione delle Ig**, poiché solo il gene V riarrangiato sarà successivamente trascritto.

L'enzima **TdT,** che catalizza l'aggiunta casuale dei nucleotidi N giunzionali, è espresso più abbondantemente durante lo stadio pro-B: si riduce prima che la ricombinazione V-J del gene per la catena leggera sia completa.

La diversità giunzionale attribuibile all'aggiunta dei **nucleotidi N nel riarrangiamento delle catene pesanti** è maggiore che in quello delle catene leggere.
Gli esoni della regione C delle catene pesanti restano separati dal complesso VDJ da una regione di DNA contenente il segmento distale di J e l'introne J-C. Il gene per la **catena pesante riarrangiato è trascritto per produrre un trascritto primario che include il complesso VDJ riarrangiato e gli esoni Cμ**.
Questo RNA nucleare viene tagliato a valle di una o di due sequenze di poliadenilazione e diverse adenine sono aggiunte all'estremità 3'.

Nel caso dell'RNA della catena μ, vengono rimossi gli introni tra l'esone principale e l'esone VD, tra l'esone VDJ e il primo esone del locus Cμ e tra ognuno degli esoni della successiva regione costante di Cμ, dando così origine a un mRNA processato per la catena μ.

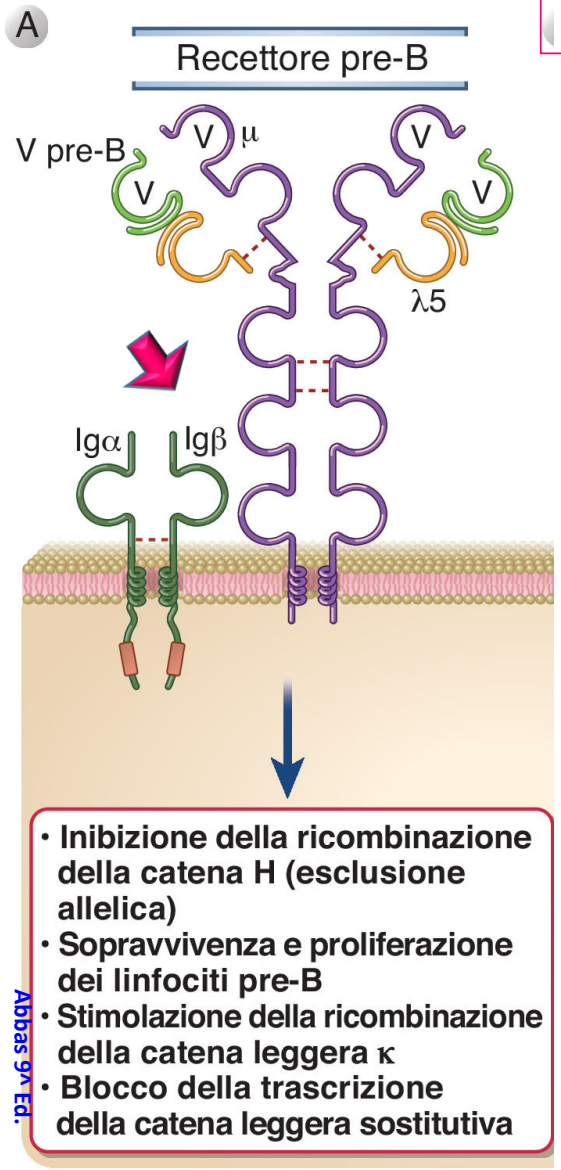
Se l'RNA deriva da un locus Ig che ha subito un **riarrangiamento "produttivo",** la traduzione dell'RNA della catena μ riarrangiato porta alla **sintesi della proteina μ**.

Per avere un riarrangiamento produttivo (**cioè una sequenza di lettura corretta**) le **basi alle giunzioni devono essere aggiunte o tolte in multipli di tre; il** gene riarrangiato codifica correttamente una proteina Ig.

Circa la metà delle cellule pro-B riesce a portare a termine un riarrangiamento del locus Ig H produttivo su almeno un cromosoma e può quindi produrre la catena μ; solo queste cellule sopravvivono e si differenziano ulteriormente

Cellule pre-B esprimono la proteina Ig μ, ma che devono ancora riarrangiare i loci per le catene leggere.

I linfociti pre-B esprimono la **catena μ** sulla loro superficie in associazione ad altre proteine, come il **recettore pre-B** che svolge un ruolo importante nella maturazione dei linfociti B.



pre-BCR

Il pre-BCR regola il riarrangiamento dei geni delle Ig

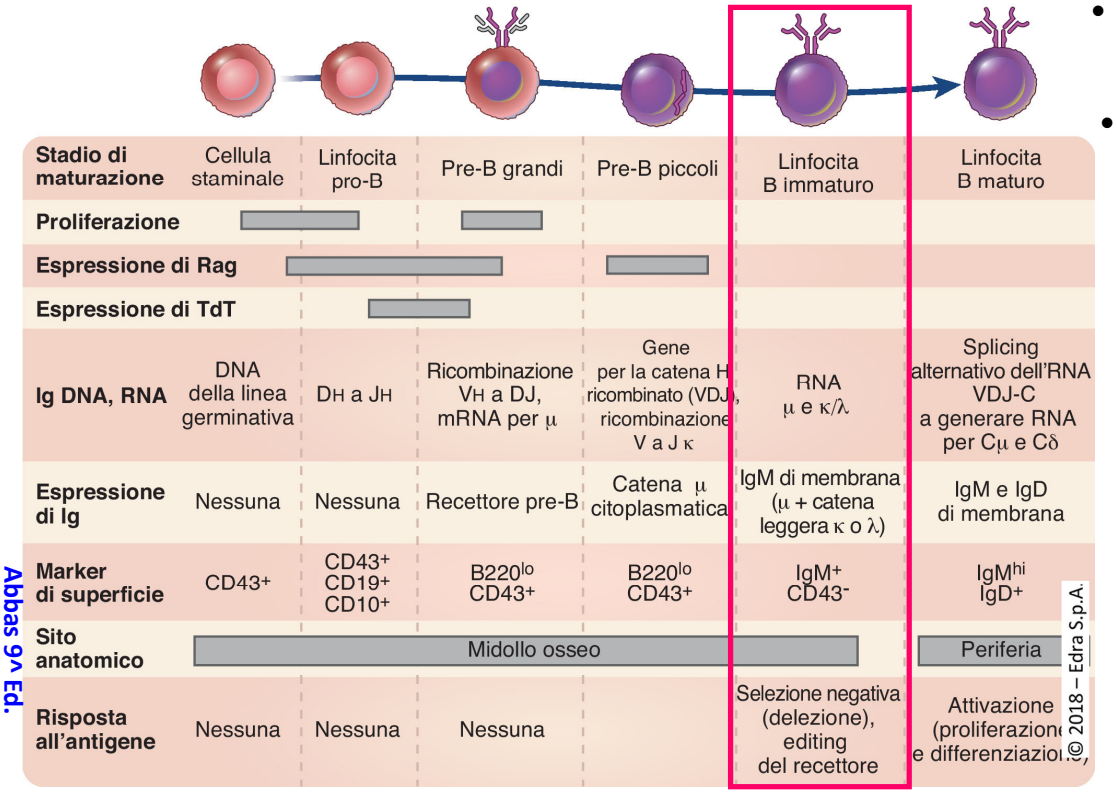
Il complesso della catena m con la catena leggera sostitutiva e le proteine Igα e Igβ, che trasducono il segnale, formano il prerecettore del linfocita B, noto anche come recettore pre-B (pre-B Cell Receptor, pre-BCR). La catena m si associa con le proteine V e λ5, a loro volta definite catene leggere sostitutive poiché strutturalmente omologhe alle catene k e λ, anche se dotate di una sequenza costante (cioè identica in tutti i linfociti pre-B)

- se la ricombinazione della catena pesante in un cromosoma riesce a **produrre una proteina μ adeguata**, il pre-BCR, inibisce irreversibilmente il riarrangiamento del locus della catena pesante sull'altro cromosoma.
- se la ricombinazione non è produttivo, ricombina l'allele delle catene pesanti sull'altro cromosoma VDJ al locus Ig H.
- **Il linfocita B può codificare proteine della catena pesante delle Ig da uno solo dei due alleli ereditati** → **esclusione allelica** (garantisce che ogni linfocita B esprima un solo recettore = **specificità clonale**).
- Se entrambi gli alleli subiscono un riarrangiamento non produttivo del gene Ig H, la cellula va incontro a **morte cellulare** programmata.
- Il linfocita pre-B prolifera e passa dallo stadio pre-B grande a quello pre-B piccolo
- il pre-BCR induce il **riarrangiamento del gene per la catena leggera**.

Linfociti B immaturi

Cellula inizia a riarrangiare i geni della catena L κ,

- se il riarrangiamento avviene correttamente sarà associata alla **catena H μ** a formare una **IgM completa**
- Se non è stato riarrangiato in modo produttivo, la cellula può riarrangiare il locus **λ.**
- Questo si verifica anche quando i recettori contenenti una catena ***κ*** sono autoreattivi,



© 2018 – Edra S.p.A.

Abbas 9^ Ed.

- La produzione di una catena ***κ*** previene il riarrangiamento dei loci **λ**
- Ogni clone linfocitario B può esprimere solo una delle catene leggere (o ***κ*** oppure **λ**) fenomeno definito esclusione isotipica della catena leggera.

I linfociti B che esprimono l'IgM di membrana sono definiti **linfociti B immaturi**, non proliferano ma differenziano in risposta agli antigeni.

I linfociti B che riconoscono l'Ag con elevata affinità possono andare incontro al processo di editing recettoriale o a morte cellulare

I linfociti B immaturi non autoreattivi **lasciano il MO** e completano la maturazione nella **milza** prima di migrare agli altri organi linfoidi secondari.

Selezione del repertorio dei linfociti B maturi

Il riconoscimento dell'Ag da parte dei linfociti B non presuppone la restrizione per MHC (non esiste un processo di selezione positivo analogo a quello dei linfociti T).

Selezione Positiva — **Solo i linfociti B che esprimono Ig di membrana funzionanti ricevono segnali di sopravvivenza**

I linfociti B immaturi che riconoscono Ag self con grande affinità possono essere indotti a modificare la loro specificità mediante il processo di **"EDITING" (revisione) RECETTORIALE** associato alla riattivazione dei geni *RAG* → riarrangiamento e produzione di una **nuova catena leggera dell'Ig**, consentendo alla cellula di esprimere un recettore diverso ("revisionato") non autoreattivo.

L'**esone VJ*κ*** (**dominio variabile** della **catena leggera** autoreattiva) viene generalmente **deleto** e sostituito (nuovo riarrangiamento tra segmento genico V***κ*** a monte e un segmento genico **J*κ*** a valle)

Se l'"editing" **non riesce a generare un riarrangiamento della catena leggera κ produttiva** "in-frame" su entrambi i cromosomi, il linfocita B immaturo **può riarrangiare il locus della catena leggera λ localizzato su un altro cromosoma**.

Quasi tutti i linfociti B che possiedono catene leggere λ sono cellule che erano autoreattive e che sono state sottoposte al processo di "editing" recettoriale.

Selezione Negativa.

Se l'**editing recettoriale non ha successo**, i linfociti B immaturi che esprimono recettori ad alta affinità per Ag self (nel MO o nella milza) **muoiono per apoptosi**

Gli antigeni che mediano tale processo sono antigeni self polivalenti (acidi nucleici, lipidi, proteine di membrana)

Sia l'**editing recettoriale** sia la **selezione negativa** sono responsabili del mantenimento della **tolleranza** dei linfociti B verso gli Ag self presenti nel midollo osseo

Una volta avvenuta la **transizione a linfocita B maturo IgD+IgM+,** il **riconoscimento dell'antigene non induce più apoptosi né editing recettoriale, bensì proliferazione e differenziazione**.

Sottopopolazioni di Linfociti B maturi

Le diverse sottopopolazioni dei linfociti B si sviluppano da progenitori specifici

Sottopopolazioni di Linfociti B maturi

Le diverse sottopopolazioni dei linfociti B si sviluppano da specifici progenitori

linfociti B-1

- Originano dalle HSC del fegato fetale
- Esprimono la molecola costimolatoria accessoria **CD5** che esercita un'azione attivatoria

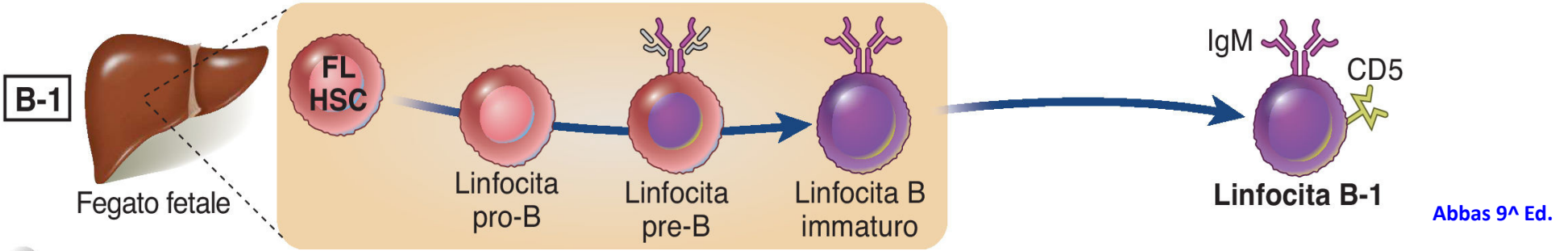
linfociti B-2

- Originano dalle HSC del midollo osseo
- Si sviluppano solo dopo la nascita
- A differenza dei B-1 esprimono **CD21**
- Differenziano in due stadi di maturazione (in funzione dell'affinità del recettore per gli Ag self):

  - linfociti B della zona marginale (BM)
  - linfociti B follicolari.

Linfociti B-1

esprimono recettori per l'Ag dotati di un repertorio limitato

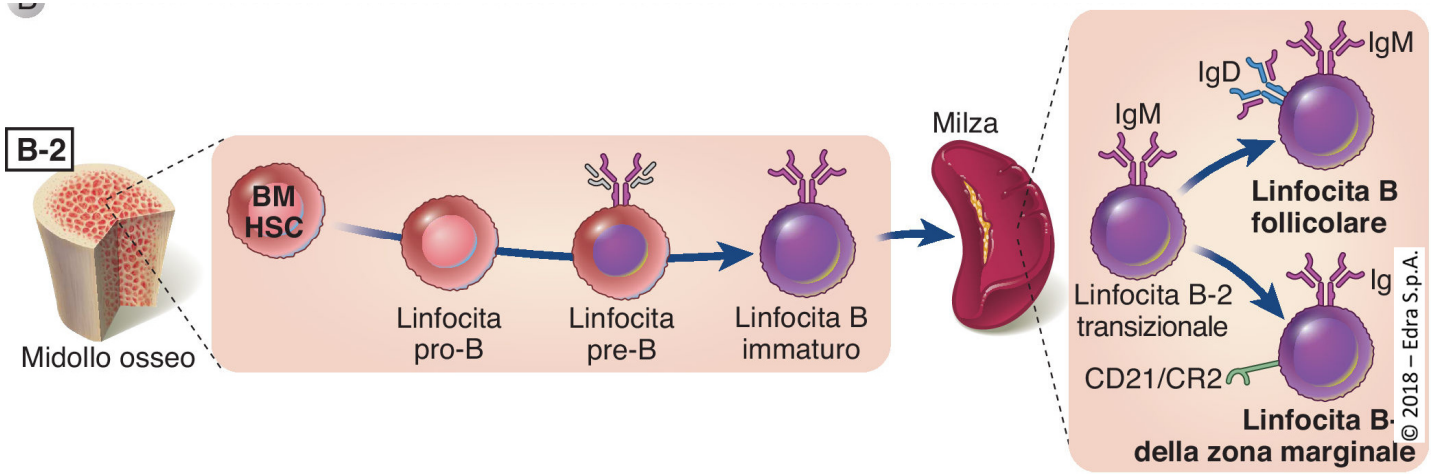


Abbas 9^ Ed.

- originano dalle HSC del fegato fetale,
- si sviluppano prima dei linfociti B follicolari e della zona marginale
- Esprimono un repertorio di geni V limitato e con minore diversità giunzionale (per la mancata espressione di TdT nel fegato fetale).
- secernono spontaneamente anticorpi **IgM** diretti contro polisaccaridi e lipidi di origine microbica (LPS) o contro i lipidi ossidati (**anticorpi naturali**) → Abs contro **Ag del sistema AB0** (derivano da un'assenza di immunizzazione, forse indotti dal microbiota intestinale)
- Sono abbondanti e attivi nei siti anatomici periferici (Mucose, GALT, BALT)

Linfociti della zona marginale

esprimono recettori per l'Ag dotati di un repertorio limitato



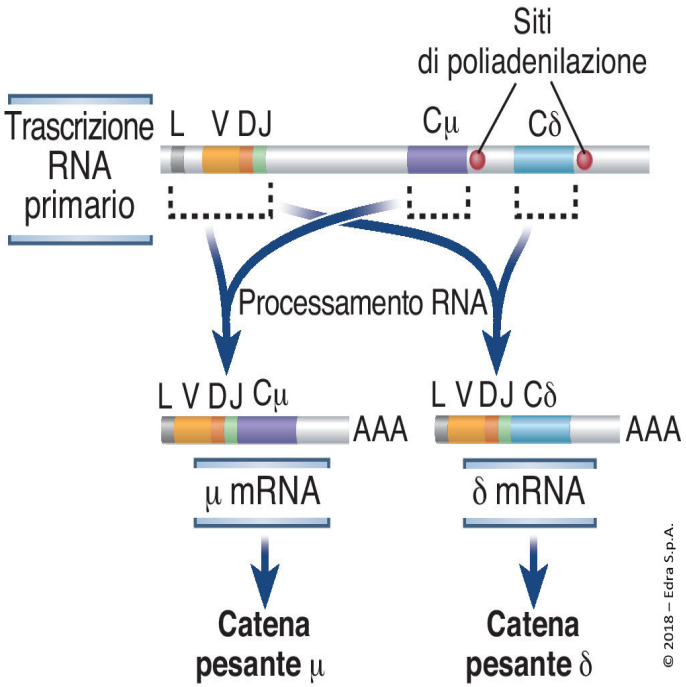
sono localizzati nella milza, (seno marginale)

Abbas 9^ Ed.

- Hanno limitata diversificazione, rispondono ad Ag polisaccaridici (LPS) producendo anticorpi naturali.
- Esprimono **IgM** e il corecettore CD21.
- rispondono molto velocemente ai batteri presenti nel sangue e differenziano in **plasmacellule a vita breve** secernenti IgM.
- mediano risposte T-indipendenti contro patogeni circolanti,

Linfociti B follicolari

esprimono un BCR con IgM e IgD come recettore di membrana.



Abbas 9v Ed.

I linfociti B follicolari sono la sottopopolazione di linfociti B maturi più numerosa

Il loro BCR può avere **catene pesanti** sia **μ** che **δ** (dovuto ad uno **splicing alternativo** degli esoni del **dominio costante)** ma **dominio V identico** → **riconoscono lo stesso Ag**

(presentano anche le **stesse catene leggere**).

L'espressione simultanea dello stesso esone riarrangiato su due trascritti (uno che include gli esoni Cμ e l'altro gli esoni Cδ) avviene per **splicing alternativo dell'RNA**

La coespressione di IgM e IgD indica l'acquisizione della **competenza funzionale** e della **capacità di ricircolare**, per tale motivo i **linfociti B IgM+IgD+** sono definiti **linfociti B maturi (ricircolanti)** perché passano da un organo linfoide all'altro, colonizzando specifiche nicchie note come ***follicoli.***

I linfociti **B maturi naïve** rispondono agli antigeni e, **in assenza di tale incontro e della conseguente risposta**, muoiono nel giro di pochi mesi.

I linfociti B sono mantenuti nei follicoli da **segnali di sopravvivenza** mediati da una citochina della famiglia del TNF detta **BAFF** (*fattore di attivazione della cellula B*) e dal ligando **APRIL.**